

LA RETINE DE LAPIN IN VITRO :
UN MODELE EXPERIMENTAL APPLICABLE
A L'ETUDE DE SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES
AGISSANT SUR LE RECEPTEUR DOPAMINERGIQUE

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Marie-Béatrice **BUCHER-THONNEY**

de

Lucerne

Thèse N° 3426

1974

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1975

**LA RETINE DE LAPIN IN VITRO :
UN MODELE EXPERIMENTAL APPLICABLE
A L'ETUDE DE SUBSTANCES PHARMACOLOGIQUES
AGISSANT SUR LE RECEPTEUR DOPAMINERGIQUE**

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en médecine

par

Marie-Béatrice BUCHER-THONNEY

de

Lucerne

Thèse N° 3426

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1975

La Faculté de médecine, sur le préavis du professeur Ralph Straub et le docteur Michel Schorderet, privat-docent, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 2 décembre 1974

Le doyen :
William Geisendorf

Thèse No 3426



Au professeur R.W. Straub pour l'honneur qu'il m'a fait de m'accueillir dans son Institut.

Au docteur M. Schorderet, privat-docent, qui a dirigé cette thèse, pour les utiles conseils et le soutien qu'il m'a prodigués au cours de son élaboration.

A Mademoiselle C. Blank qui, par sa compétence, m'a rendu de grands services.

A Madame D. Tabin, secrétaire.

A Monsieur P. Willy, pour son aimable assistance technique.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545906_0025

I. INTRODUCTION

C'est en se basant sur des comparaisons de concentrations de dopamine et de noradrénaline dans différents tissus nerveux que Blaschko¹ en 1957 suggéra que dans le système nerveux des mammifères, la dopamine jouait non seulement le rôle de précurseur de la noradrénaline, mais possédait des fonctions physiologiques propres.

Grâce à des techniques de fluorescence histo-chimiques, il fut possible de localiser la dopamine dans des structures neuronales de système nerveux des vertébrés et des invertébrés^{2,3}.

Chez les mammifères, les premiers neurones dopaminergiques furent découverts dans la rétine⁴, puis dans le striatum^{5,6}, enfin dans le système limbique⁷, au niveau du tubercule olfactif, du noyau accubens et du noyau amygdaloïde central. Par la suite, Häggendal et Malmfors⁸, localisant plus précisément des neurones dopaminergiques dans la rétine de lapin à la jonction de la granulaire interne et de la plexiforme interne, postulèrent que la dopamine pourrait être un neurotransmetteur rétinien.

Classiquement les neuropharmacologues⁹ ont formulé cinq critères servant à démontrer le rôle de neurotransmetteur d'une substance endogène que l'on suppose douée de cette propriété physiologique. Dans le cas de la dopamine, il s'agissait donc :

- de localiser cette amine biogène dans les neurones dopaminergiques présumés,
- de mettre en évidence les voies biosynthétiques et cataboliques du neurotransmetteur,
- d'observer une libération de dopamine en réponse à la stimulation des terminaisons présynaptiques,
- d'enregistrer une stimulation ou une inhibition de l'activité des cellules ganglionnaires post-synaptiques en réponse à l'application directe de dopamine,

- de bloquer par des agents pharmacologiques efficaces sur d'autres récepteurs dopaminergiques reconnus, les effets du neurotransmetteur sur les structures neuronales.

Kramer¹⁰, se référant aux travaux d'Häggendal et Malmfors⁸, étudia du point de vue pharmacologique le rôle de la dopamine au niveau de la rétine du chat. D'une part, il montra que les cellules contenant de la dopamine étaient morphologiquement semblables aux cellules amacrines mais probablement douées de propriétés physiologiques distinctes; d'autre part, il prouva dans son travail que la dopamine répondait parfaitement aux postulats émis par les neuropharmacologues et qu'elle se trouvait être un véritable neurotransmetteur.

Après avoir reconnu la dopamine comme un neurotransmetteur, l'on supposa que ses effets physiologiques pouvaient vraisemblablement être dépendants du second messenger, à savoir l'AMPC, par analogie avec le mécanisme d'action d'autres amines biogènes telles que l'adrénaline ou la noradrénaline.

C'est ainsi que Brown et Makman¹¹, dans des homogénats de rétines de rat et de veau, et Kebabian et al.^{12,13}, dans des coupes de ganglions cervicaux supérieurs de bovidés, mettent simultanément en évidence une adénylate cyclase sélectivement activée par de faibles concentrations de dopamine et spécifiquement inhibée par des agents bloqueurs des récepteurs dopaminergiques tels que l'halopéridol et la chlorpromazine. Kebabian et al.¹⁴ localisent ultérieurement une adénylate cyclase sensible à la dopamine au niveau du striatum. Récemment Horn et al.¹⁵ d'une part, et Clément-Cormier et al.¹⁶ d'autre part, mettent en évidence un même type d'enzyme dans le système limbique.

Notre travail, de type pharmacologique, s'inspire des précédents : il consiste à mesurer l'activité

de l'adénylate cyclase en réponse à différentes substances susceptibles d'activer ou de bloquer les récepteurs dopaminergiques de la rétine isolée du lapin.

En utilisant deux types de préparations, à savoir des homogénats de rétines ou des rétines intactes, dans lesquelles il est possible de tester le même paramètre expérimental, on devait être en mesure d'élucider ou de confirmer, au niveau subcellulaire (homogénats) ou au niveau cellulaire (rétines intactes), le mécanisme d'action de différentes drogues :

1) L'apomorphine¹⁷⁻¹⁹, substance appelée "dopamine-like" soit parce que l'on peut déceler dans sa formule chimique des analogies de structure avec la formule de la dopamine, soit parce que sous l'effet de cette substance appliquée in vivo, l'on constate une activation du système neuronal du striatum,

2) Les neuroleptiques^{17,20,21}, (type phénothiazines et halopéridol) bloqueurs présumés des récepteurs dopaminergiques,

3) Les antiparkinsoniens, et plus particulièrement l'amantadine²², dont le mécanisme d'action est vraisemblablement en rapport avec le métabolisme de la dopamine ou avec l'interaction du neurotransmetteur sur le récepteur post-synaptique,

4) La mescaline²³, agent psychotomimétique dont le mode d'action se situe hypothétiquement au niveau des récepteurs α -adrénergiques ou dopaminergiques.

II. MATERIEL ET METHODES

A. Homogénats de rétines de lapin

Les yeux de lapin (3 animaux sacrifiés par expérience) sont immédiatement énucléés et la section antérieure de l'oeil est dégagée en coupant légèrement en arrière du limbe; les rétines sont alors détachées au pinceau, déconnectées du nerf optique et plongées dans un tampon contenant²⁴ 0,25 mM de sucrose, 50 mM de TRIS-HCl pH 7,4, 25 mM de KCl, 5 mM de $MgCl_2$. Elles sont ensuite transférées dans un homogénéisateur de verre de type Potter contenant 1,5 ml du même tampon additionné de 2 mM d'EGTA et homogénéisées jusqu'à ce que tous les fragments rétinien soient grossièrement broyés. L'homogénat est ensuite centrifugé à 2100 rpm pendant 15 minutes à 4°C, l'opération étant répétée avec un même volume de tampon-EGTA. On élimine le surnageant et resuspend l'homogénat dans 1,5 ml de tampon-EGTA. Les tubes à essai (12 tubes/6 rétines) contiennent soit 1,1 ml de tampon (50 mM de TRIS-HCl pH 7,4, 2 mM d'ATP, 3 mM de $MgCl_2$, 10 mM de NaCl, 10 mM de KCl, 6 mM de théophylline et 2 mM d'EGTA)²⁴, soit 1,0 ml de même tampon additionné de 0,1 ml d'une solution de l'hormone à tester, dissoute préalablement dans le tampon. On ajoute 0,1 ml de la suspension d'homogénat dans les tubes à essai et déclenche simultanément une incubation de 2 min 30 sec à 30°C. L'incubation terminée, on plonge les tubes dans un bain-marie bouillant pour une durée de 3 min, puis on les centrifuge à 3050 rpm pendant 15 min à 4°C. On passe le surnageant (1,0 ml) sur une colonne échangeuse d'ions (Dowex 50-W-X-8) et récolte l'AMPc (70% de rendement) dans une fraction de 3 ml (7^e, 8^e et 9^e ml), l'eau servant d'éluant. On lyophilise un aliquot de cette fraction (0,05 à 0,1 ml) en duplication et on resuspend le lyophi-

lisat dans 20 μ l d' H_2O pour la détermination de l'AMPc selon la méthode de saturation isotopique décrite par Brown et al.²⁵. On solubilise le précipité dans 1,0 ml de NaOH 0,5 N contenant 5% de lauryl sulfate de Na pour la détermination des protéines^{26,27}.

B. Rétines intactes

Les rétines sont prélevées selon la même technique (3 à 5 lapins par expérience), plongées dans une solution à 4°C de tampon Krebs-Ringer bicarbonate pH 7,4, préalablement oxygéné, puis incubées pendant 40 min dans 20 ml du même tampon à 35°C. Chaque rétine ou demi-rétine est ensuite suspendue dans 1,0 ml de tampon Krebs-Ringer bicarbonate contenant en plus 5 mM de théophylline. La stimulation débute par l'addition de 0,1 ml d'une solution d'un agent pharmacologique ou, pour les valeurs de contrôle de 0,1 ml du même tampon Krebs-Ringer-théophylline. Les tubes à essai sont incubés pendant 10 min à 35°C sous oxygénation constante (95% O_2 -5% CO_2). On ajoute alors 0,1 ml d'acide trichloracétique à 50%, homogénéise le tissu puis le centrifuge à 3050 rpm pendant 15 min à 4°C. On prélève 1,0 ml de surnageant et le neutralise par 0,1 ml de TRIS 3,5 M. 1,0 ml de solution est alors purifié sur résine échangeuse d'ions selon le procédé décrit sous A avant de mesurer la concentration en AMPc selon Brown et al.²⁵. La détermination des protéines se fait selon la méthode décrite sous A. Pour identifier l'AMPc, certains extraits lyophilisés sont traités dans des conditions optimales avec la phosphodiesterase (Boehringer). Une fraction du surnageant est reprise et soumise à la méthode isotopique de Brown²⁵. Les valeurs d'AMPc approchent de 0 pmoles pour les tubes traités avec la phosphodiesterase, alors que les teneurs en AMPc des tubes témoins (sans phosphodiesterase) ne sont pas modifiés.

III. RESULTATS

A. Homogénats de rétines de lapin

La figure 1 montre les courbes dose-réponse pour la dopamine et l'apomorphine appliquées sur des homogénats de rétines (préparation A). En réponse à la catécholamine, le seuil de stimulation se situe aux environs de $0,5 \mu\text{M}$, alors que la stimulation maximale est obtenue pour une concentration hormonale de $100 \mu\text{M}$. A cette concentration on mesure $253,9 \pm 9,8$ (S.E.M.) AMPc.mg de protéine⁻¹.2,5 min⁻¹ soit une augmentation de 95% par rapport aux valeurs de contrôle ($130,4 \pm 4,3$ pmoles AMPc.mg de protéine⁻¹.2,5 min⁻¹). Quoique moins efficace que la dopamine, l'apomorphine est un bon activateur de l'adénylate cyclase. Le seuil de stimulation, qui n'est pas illustré dans la figure 1, se situe également aux environs de $0,5 \mu\text{M}$, alors que la stimulation maximale est obtenue pour une concentration de $10 \mu\text{M}$, concentration pour laquelle on mesure $190,0 \pm 15,0$ pmoles AMPc.mg de protéine⁻¹.2,5 min⁻¹, augmentation de 45,5% par rapport aux valeurs de contrôle. A la différence de ce que l'on observe avec la dopamine, l'activité enzymatique semble diminuée pour une concentration d'apomorphine de $100 \mu\text{M}$ (voir également Bucher et Schorderet^{28,29}).

La figure 2 compare les effets de la dopamine aux effets des diverses catécholamines, agonistes α , agonistes β ou agonistes mixtes $\alpha\beta$, à $10 \mu\text{M}$, sur la formation d'AMPc dans des homogénats de rétines de lapin. Les résultats sont exprimés ici en Δ par rapport aux valeurs de contrôle. La noradrénaline et l'adrénaline produisent une augmentation de $62,9 \pm 14,3$ et $67,0 \pm 11,1$ pmoles AMPc.mg de protéine⁻¹.2,5 min⁻¹ respectivement, soit environ 56 et 59% de l'augmentation en AMPc produite par la même concentration de dopamine ($112,3 \pm 16,3$ pmoles

AMPC.mg de protéine⁻¹.2,5 min⁻¹. L'isoprotérénol (agoniste β) et la phényléphrine (agoniste α) n'ont par contre aucun effet, les Δ obtenus pour chaque agoniste n'étant pas significativement différents des valeurs de contrôle.

Le tableau 1 montre les effets de la phentolamine (antagoniste des récepteurs α -adrénergiques) de l'halopéridol et de la chlorpromazine (antagonistes des récepteurs dopaminergiques) sur l'augmentation de l'AMPC induite par 10 μ M et également 100 μ M de dopamine, dont le Δ (par rapport aux valeurs de contrôle) est respectivement de $112,3 \pm 16,3$ et $121,6 \pm 8,8$ pmoles AMPC.mg de protéine⁻¹.2,5 min⁻¹. En présence de phentolamine (50 μ M), il subsiste une augmentation résiduelle de $12,8 \pm 13,0$ pmoles AMPC.mg de protéine⁻¹.2,5 min⁻¹. Par contre, en présence des deux neuroleptiques (50 μ M), la production d'AMPC induite par la dopamine semble être complètement abolie.

Une série d'expériences ont été réalisées également sur ce type de préparation (homogénats), pour tester la réponse à l'application de mescaline d'une part, et d'amantadine d'autre part. Aucune augmentation (ou diminution) d'AMPC par rapport aux valeurs de contrôle n'a été constatée.

B. Rétines intactes

Le tableau 2 montre les effets de la dopamine, de l'apomorphine, de l'adrénaline et de la noradrénaline à 100 μ M, sur la concentration endogène d'AMPC dans les conditions expérimentales décrites sous II, en l'absence et en présence de 500 μ M d'halopéridol.

Les résultats sont exprimés dans chaque cas en Δ par rapport aux valeurs de contrôle, celles-ci résultant de la mesure, pour chaque type d'expérience, de l'AMPC dans un même nombre de demi-rétines ou de rétines entières prélevées sur les mêmes animaux.

Il semble que dans la rétine isolée intacte, l'apomorphine ($\Delta = 43,1 \pm 10,2$ pmoles)AMPc.mg de protéine⁻¹. 10 min⁻¹ soit plus efficace que la dopamine ($\Delta = 26,3 \pm 4,6$), l'adrénaline ($\Delta = 22,4 \pm 3,0$) ou la noradrénaline ($\Delta = 21,5 \pm 3,1$), les effets des 3 catécholamines paraissant approximativement comparables (voir également Bucher et Schorderet³⁰). Quant à l'halopéridol, susceptible de bloquer les récepteurs dopaminergiques, il semble moins efficace sur les rétines intactes que sur les homogénats de rétines (cf. page 6), bien que son effet inhibiteur, comme antagoniste de l'apomorphine en particulier, ainsi que des 3 catécholamines, soit évident.

Le tableau 3 montre que ni l'amantadine (100 μ M), ni la mescaline (10 μ M), à l'instar de ce qui était observé pour les homogénats, ne possèdent la capacité d'augmenter (ou de diminuer) la concentration d'AMPc dans la rétine isolée intacte.

IV. DISCUSSION

La rétine, organe sensoriel de la vision, est constituée de cellules dérivées embryologiquement du système nerveux central. Cinq types de cellules sont responsables de transmettre l'information visuelle au cortex optique. Cette information suit deux directions perpendiculaires à travers la rétine. La première est une voie sensorielle transversale qui est composée de trois types de cellules, à savoir les cônes et les bâtonnets (cellules réceptrices), les cellules bipolaires et les cellules ganglionnaires. La seconde voie est une voie latérale comportant deux types de cellules, les cellules horizontales et les cellules amacrines. Il résulte de ces régulations anatomiques que tout stimulus passant par la voie transversale est fortement influencé par l'activité des cellules latérales^{31,32} (figure 3). Chaque communication intercellulaire est réglée par un médiateur chimique (transmetteur) qui modifie les propriétés électriques de la membrane cellulaire-cible. La dopamine est l'un des médiateurs chimiques qui nous intéresse particulièrement. Elle prédomine au niveau rétinien et elle a été localisée dans des cellules morphologiquement semblables aux cellules amacrines. Elle joue un rôle dans le système latéral de régulation de la vision, rôle qui a été étudié par Kramer¹⁰ dans la rétine du chat. Cet auteur démontra que la stimulation lumineuse sur la rétine produisait une libération de dopamine, celle-ci diminuant la sensibilité rétinienne. Cette constatation confirmait l'observation faite en 1963 par Häggendal et Malmfors⁸ qui avaient remarqué que les animaux traités avec de la réserpine souffraient de photophobie. Ils avaient conclu alors à une déplétion en amines biogènes de certaines terminaisons nerveuses de la rétine.

La dopamine est un transmetteur lié au système adrénergique. Libérée lors d'une stimulation du neurone présynaptique, elle se fixe sur un récepteur postsynaptique, dont le discriminateur est localisé sur la face externe de la membrane plasmique. L'information passe ensuite par un transducteur intra-membranaire, relié à un amplificateur fixé sur la face interne de la membrane et responsable de la réponse biochimique : l'activation d'une adénylate cyclase génératrice d'AMPC, second messenger qui stimule à son tour l'activité d'enzymes-cibles intracellulaires (protéines-kinases) responsables de la réponse physiologique³³.

Dans le système adrénergique, l'on distingue 3 types de récepteurs principaux, les récepteurs α , les récepteurs β et les récepteurs dopaminergiques. Cette classification est établie selon 2 critères³⁴ :

- l'efficacité de l'agoniste sur le système effecteur, l'agoniste le plus puissant étant le représentant du système,
- le blocage sélectif du récepteur par des antagonistes spécifiques (tableau 4).

Les agonistes ont en commun une structure chimique très voisine (noyau catéchol), seule diffère la chaîne latérale (éthylamine ou éthanolamine) (Figure 4). C'est ainsi que s'explique une activité biologique souvent comparable. Les récepteurs dopaminergiques sont bloqués par les neuroleptiques (tableau 4). Horn et Snyder³⁵ expliquent ce mécanisme d'action de la manière suivante : comparant la structure analysée par cristallographie aux rayons X de la chlorpromazine et de la dopamine, ils démontrent comment la molécule de dopamine se superpose à une partie de la molécule de chlorpromazine (figure 5). Cette partie superposable se fixerait sur le même récepteur et empêcherait toute action de la dopamine.

Nos résultats montrent que dans les homogénats de rétines de lapin et dans les rétines entières du même animal, il existe une adénylate cyclase particulièrement sensible à la dopamine. Dans les homogénats, la dopamine est le plus puissant activateur de l'adénylate cyclase. Le seuil de stimulation se situe aux environs de $0,5 \mu\text{M}$ et l'effet est maximum à la concentration de $100 \mu\text{M}$. Comparant les résultats obtenus par Brown et Makman¹¹ sur des homogénats de rétines de rat et de veau et ceux de Kebabian et al.¹⁴ sur des homogénats de noyau caudé, nous constatons que dans les mêmes conditions expérimentales, l'activité spécifique de l'adénylate cyclase d'homogénats de rétines de lapin est jusqu'à 4 fois plus élevée que l'activité de cette même enzyme dans des homogénats de rétines de rat, de veau et de noyau caudé. Les variations de la production d'AMPc en réponse à la dopamine au niveau rétinien semblent s'expliquer par une spécificité d'espèce plutôt que d'organe. Clément-Cormier et al.¹⁶ par exemple, observent des taux de production d'AMPc variant du simple au triple dans le noyau caudé de différentes espèces de mammifères.

Etudiant les effets des neuroleptiques, nous avons remarqué que la chlorpromazine à la concentration de $50 \mu\text{M}$ inhibait complètement l'effet de $10 \mu\text{M}$ de dopamine et que l'halopéridol à la même concentration mais en présence de $100 \mu\text{M}$ de dopamine avait également un effet inhibiteur total. Plusieurs investigateurs^{14,16,17} ont montré que les neuroleptiques à des concentrations variant de $0,5$ à $20 \mu\text{M}$ empêchaient l'activation du récepteur par 20 à $40 \mu\text{M}$ de dopamine. Clément-Cormier et al.¹⁶, par exemple, utilisent la plus faible concentration d'un neuroleptique (fluphénazine $0,5 \mu\text{M}$) pour bloquer l'effet de la plus forte concentration de dopamine ($40 \mu\text{M}$) dans un homogénat de noyau accubens de cobaye. Quant à la phentolamine, agoniste des récepteurs α -adrénergiques, à

la concentration de 50 μM , elle ne semble pas bloquer complètement l'effet de 10 μM de dopamine. Keabian et al.¹⁴ ont montré, sur des homogénats de noyau caudé, que cet antagoniste (80 μM) s'opposait également à la stimulation par la dopamine du récepteur dopaminergique présumé (50% d'inhibition). Dans certains cas, le récepteur dopaminergique semble se comporter vis-à-vis des antagonistes comme un récepteur α -adrénergique. Cette particularité apparaît en tout cas bien établie dans les ganglions cérébraux de l'escargot², où la dopamine agit apparemment sur un récepteur de type α puisque le récepteur est bloqué par l'ergométrine et la phénoxybenzamine et n'est pas activé par l'apomorphine. L'effet de la noradrénaline et de l'adrénaline est de 10 à 100 fois moindre sur le récepteur que celui de la dopamine. Il faut donc en conclure que les récepteurs α -adrénergiques et dopaminergiques se dissocient difficilement et que les critères de classification des récepteurs adrénergiques ne sont pas des barrières rigides. La noradrénaline et l'adrénaline exercent une influence non négligeable sur le récepteur dopaminergique des homogénats de rétines de lapin. A la concentration de 10 μM , elles produisent une augmentation d'AMPc qui atteint environ la moitié de celle due à la dopamine à la même concentration. La phényléphrine, agoniste α et l'isoprotérénol, agoniste β , toujours en fonction du même paramètre expérimental, ne semblent pas avoir d'effets activateurs ou inhibiteurs sur le récepteur dopaminergique. Ceci confirme les résultats obtenus, en réponse à l'isoprotérénol sur les préparations de tubercule olfactif ou de noyau caudé^{14,16}.

Par l'utilisation de rétines intactes, nous avons cherché à établir un parallèle entre le système acellulaire (activité enzymatique des homogénats) et le système cellulaire intact (concentration endogène d'AMPc).

La dopamine à la concentration de $100\text{ }\mu\text{M}$ produit une augmentation de $26,3 \pm 4,6\text{ pmoles.mg protéine}^{-1}.10\text{ min}^{-1}$ (Δ). L'adrénaline et la noradrénaline sont aussi des activateurs efficaces de l'adénylate cyclase des rétines intactes. Nous avons constaté, en réponse à ces deux catécholamines, une augmentation d'AMPc comparable à celle obtenue en présence de dopamine. Brown et Makman¹¹ ont également observé que l'augmentation d'AMPc produite par ces trois catécholamines était comparable. Il apparaît donc que, appliqué sur des rétines intactes, l'effet de la dopamine n'est pas du tout aussi sélectif qu'un effet observé sur des homogénats. De plus, l'inhibition par les neuroleptiques ($500\text{ }\mu\text{M}$) de l'effet stimulateur de $100\text{ }\mu\text{M}$ de dopamine, de noradrénaline et d'adrénaline n'est pas totale puisqu'il subsiste une augmentation résiduelle d'AMPc. C'est également là une caractéristique qui différencie les préparations d'homogénats de celles des rétines entières.

Depuis la découverte d'une diminution de la concentration de dopamine dans le striatum de personnes souffrant de la maladie de Parkinson³⁶, les recherches se sont concentrées sur le développement de médicaments susceptibles d'agir sur le récepteur dopaminergique. L'apomorphine en est l'un d'eux. Il a été démontré qu'une partie de sa structure est superposable à la forme trans de la molécule de dopamine¹⁸. Du point de vue pharmacologique, l'apomorphine modifie le turnover de la dopamine. Selon certains auteurs³⁷, elle inhiberait la tyrosine hydroxylase, enzyme synthétisant la dopamine par hydroxylation de la tyrosine et conduirait ainsi à une diminution de la synthèse de la dopamine (et des catécholamines) dans le neurone. Selon d'autres auteurs³⁸, l'apomorphine agirait directement sur le récepteur dopaminergique en induisant un feed-back négatif qui diminuerait la concentration de dopamine dans le neurone. In vitro, dans les deux cas, il y aurait une diminution de la concentration de dopamine dans le neurone.

Mais il est peu vraisemblable que les changements fonctionnels constatés lors d'administration d'apomorphine soient associés à son action sur le turnover de la dopamine. In vivo, l'apomorphine injectée à des rats^{39,40} induit une hyperactivité motrice que l'on peut mesurer selon des critères expérimentaux spécifiques. Les auteurs⁴⁰ expliquent ce comportement par une stimulation des neurones dopaminergiques au niveau du striatum : l'effet de l'apomorphine peut être aboli par l'injection de bloqueurs des récepteurs dopaminergiques tels que la chlorpromazine. Dans ces exemples-là, l'apomorphine "mimiquerait" la dopamine au niveau du récepteur, d'où le terme de substance "dopamine-like" qu'on lui a attribué.

L'apomorphine est un activateur efficace de l'adénylate cyclase d'homogénats rétiniens de lapin. Le maximum de stimulation est obtenu pour une concentration de 10 μM (environ 50% par rapport à la stimulation par la dopamine à 10 μM) et le seuil de stimulation se situe aux environs de 0,5 μM . Pour des concentrations supérieures à 10 μM , l'activité enzymatique diminue. Il est intéressant de remarquer que Kebabian et al.¹⁴ constatent la même diminution dans les homogénats de noyau caudé, diminution restant encore inexpliquée. Dans nos préparations de rétines intactes, c'est l'apomorphine qui est le stimulateur le plus efficace de la production d'AMPC. Il semble que les rétines intactes de lapins soient particulièrement sensibles à une stimulation par l'apomorphine. Brown et Makman¹⁷, en effet, obtiennent en réponse à l'application d'apomorphine d'une part, et de dopamine d'autre part, des résultats sensiblement identiques et peu modifiés par rapport aux valeurs de contrôle. L'apomorphine apparaît donc dans notre cas (rétines intactes) comme un activateur du récepteur dopaminergique plus puissant que le neurotransmetteur propre, alors que le contraire semble être le cas en présence des homogénats du même tissu. Il semblerait

que dans les conditions de cellules intactes (rétines entières), les paramètres biologiques soient mieux respectés : l'apomorphine, pour un maximum d'efficacité, a peut-être besoin d'un complexe discriminateur-transducteur-amplificateur intégral³⁰; dans le cas d'une homogénéisation partielle, il est supposé que seul subsiste l'amplificateur, à savoir le site catalytique, dont la présence est vraisemblablement suffisante pour que la stimulation par le neurotransmetteur vrai (dopamine) soit maximale.

L'amantadine, agent antiviral découvert en 1964, s'est révélé fortuitement être un médicament anti-parkinsonien. De nombreuses études ont dès lors été entreprises dans le but de déterminer quel pourrait être le mécanisme d'action de l'amantadine en tant qu'agent anti-parkinsonien. Comme la plupart des substances exerçant une action thérapeutique au niveau du striatum modifient le turnover de la dopamine, Vaatstra et al.⁴¹ ont étudié in vivo et in vitro l'influence de l'amantadine sur le turnover de cette catécholamine par la mesure de la concentration des métabolites. Quelle que soit la technique utilisée, ces auteurs ont conclu qu'en réponse à l'amantadine, ce turnover n'était pas modifié. L'action anti-parkinsonienne de l'amantadine au niveau du striatum n'est pas en relation directe avec le système dopaminergique. Cependant, bien que la structure chimique de l'amantadine (figure 6) ne présente pas une analogie proche de celle de la dopamine, il a été suggéré²² qu'elle pourrait stimuler directement le récepteur dopaminergique. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons dosé la concentration d'AMPC en réponse à l'application d'amantadine, dans nos préparations d'homogénats rétiniens et dans les rétines intactes. Dans les deux cas, nous n'avons observé ni augmentation ni diminution de la concentration en AMPC. Parallèlement, Clément-Cormier

et al.¹⁶ ont constaté que l'amantadine n'avait aucun effet sur l'activité de l'adénylate cyclase d'homogénats de noyau caudé. Ces deux résultats confirment que l'effet de l'amantadine est indépendant du système et des récepteurs dopaminergiques, le mécanisme d'action réel restant encore à élucider.

La mescaline, substance extraite d'un cactus peyotl, est connue depuis fort longtemps d'une secte d'Indiens d'Amérique du Nord qui ingérait cette plante sacrée lors de cérémonies religieuses. Le principe actif, isolé à la fin du siècle dernier, fut utilisé pour induire des psychoses expérimentales et reste l'apanage des toxicomanes en recherche de drogues dites fortes. C'est en 1918 que la structure de la mescaline fut décrite. Vu l'existence d'une certaine analogie entre la formule de la mescaline et celle des catécholamines (figure 6), l'on s'est demandé si cet agent psychotrope agissait par l'intermédiaire de récepteurs adrénergiques. In vitro, Clemente et al.²³ ont montré que la mescaline produisait une augmentation de la motilité de l'ileum isolé du cobaye et du chat, augmentation bloquée par la phenoxybenzamine. Ces auteurs suggérèrent que la mescaline pourrait stimuler sélectivement les récepteurs α -adrénergiques. Comme certaines substances exercent leurs effets à la fois sur le récepteur α -adrénergique et sur le récepteur dopaminergique, nous avons appliqué la mescaline sur nos préparations riches en récepteurs dopaminergiques. Nous n'avons constaté aucune modification de la concentration d'AMPC en réponse à l'application de 10 μ M de mescaline, ni dans nos préparations de rétines intactes ni dans celles d'homogénats.

Dans le système nerveux des mammifères, il existe plusieurs médiateurs chimiques assurant la transmission nerveuse. Dans la rétine de lapin, il semble que

la dopamine soit le principal médiateur de la transmission nerveuse puisque la noradrénaline s'y trouve à une concentration 75 fois inférieure à celle de la dopamine⁸. La rétine de lapin est donc une préparation satisfaisante pour l'étude de substances agissant spécifiquement et sélectivement sur le récepteur dopaminergique. Elle offre également l'avantage de nous permettre de travailler sur des homogénats (cellules rupturées) aussi bien que sur des cellules nerveuses intactes. Nous avons pu ainsi satisfaire les deux premiers critères de Sutherland⁴² démontrant la médiation par l'AMPC d'une action hormonale :

- nous avons stimulé l'adénylate cyclase, isolée à partir d'homogénats rétiniens, par les hormones physiologiquement actives, en particulier par la dopamine,

- nous avons obtenu une augmentation de la concentration en AMPC intracellulaire en réponse à l'application des hormones physiologiquement actives, dans des rétines isolées entières.

D'autre part, nous avons pu étudier le mécanisme d'action des stimulateurs et bloqueurs potentiels du récepteur dopaminergique, aussi bien au niveau cellulaire (sur des rétines intactes), qu'au niveau subcellulaire (dans des homogénats). Nous avons ainsi constaté que dans des homogénats rétiniens, la dopamine était un activateur plus puissant de l'adénylate cyclase que l'apomorphine, alors que la situation inverse se présentait avec des rétines intactes. Nous avons émis l'hypothèse d'une atteinte du complexe discriminateur-transducteur-amplificateur dans les préparations d'homogénats rétiniens, complexe dont l'intégrité structurale devrait être respectée pour l'obtention d'un effet maximum de l'apomorphine. Cette intégrité structurale n'est pas nécessaire pour déclencher une stimulation optimale des catécholamines, et en particulier, de la dopamine. Quant aux neuroleptiques tels que l'halopéridol et la chlorpromazine, bloqueurs

pharmacologiques des récepteurs dopaminergiques, ils semblent plus efficaces sur des préparations d'homogénats rétiniens que sur des rétines entières. Le maintien d'un système membranaire intact n'apparaît pas là non plus comme indispensable à un effet pharmacologique maximum. Dans le cas précis où l'halopéridol ne bloque pas complètement l'effet de l'apomorphine appliquée sur des cellules rétiniennes intactes, on pourrait suggérer que la concentration des neuroleptiques n'est peut-être pas suffisamment élevée pour neutraliser l'effet prédominant de l'agoniste, dans une interaction de type compétitif. Enfin, ni la mescaline ni l'amantadine n'ont d'action inhibitrice ou stimulatrice de l'adénylate cyclase des récepteurs dopaminergiques de la rétine homogénéisée ou intacte. La mescaline semble donc agir indépendamment de cette enzyme propre aux récepteurs β -adrénergiques ou dopaminergiques, son effet est peut-être lié à une interaction non enzymatique avec les récepteurs α -adrénergiques. Quant à l'amantadine, il se pourrait que ses effets anti-parkinsoniens soient dus à une interaction avec un autre type de récepteurs également importants, à savoir les récepteurs cholinergiques muscariniques.

En conclusion, la rétine de lapin, intacte ou homogénéisée, semble être un modèle expérimental approprié pour l'approche pharmacologique du récepteur dopaminergique, pour le développement de médicaments anti-parkinsoniens ou neuroleptiques, ou pour l'étude du mode d'action encore hypothétique de certaines drogues psychotropes.

Figure 1

Courbes dose-réponse pour la dopamine et l'apomorphine dans des homogénats de rétines de lapin

Δ cAMP (p moles)

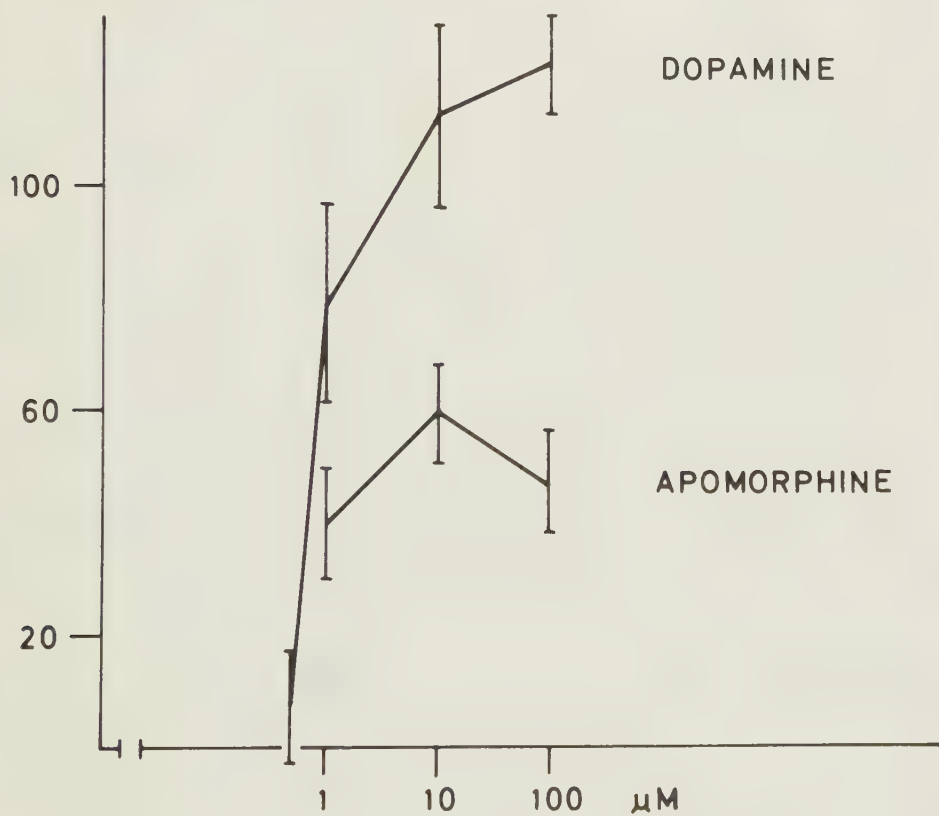


Figure 2

Effets de divers agonistes adrénériques sur la production d'AMPc dans des homogénats de rétines de lapin

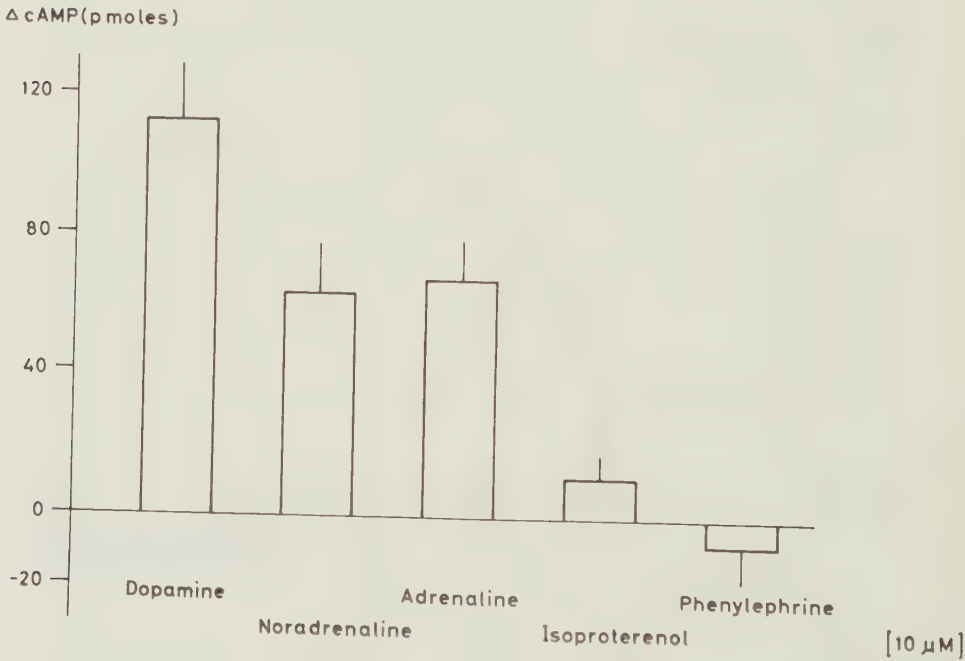
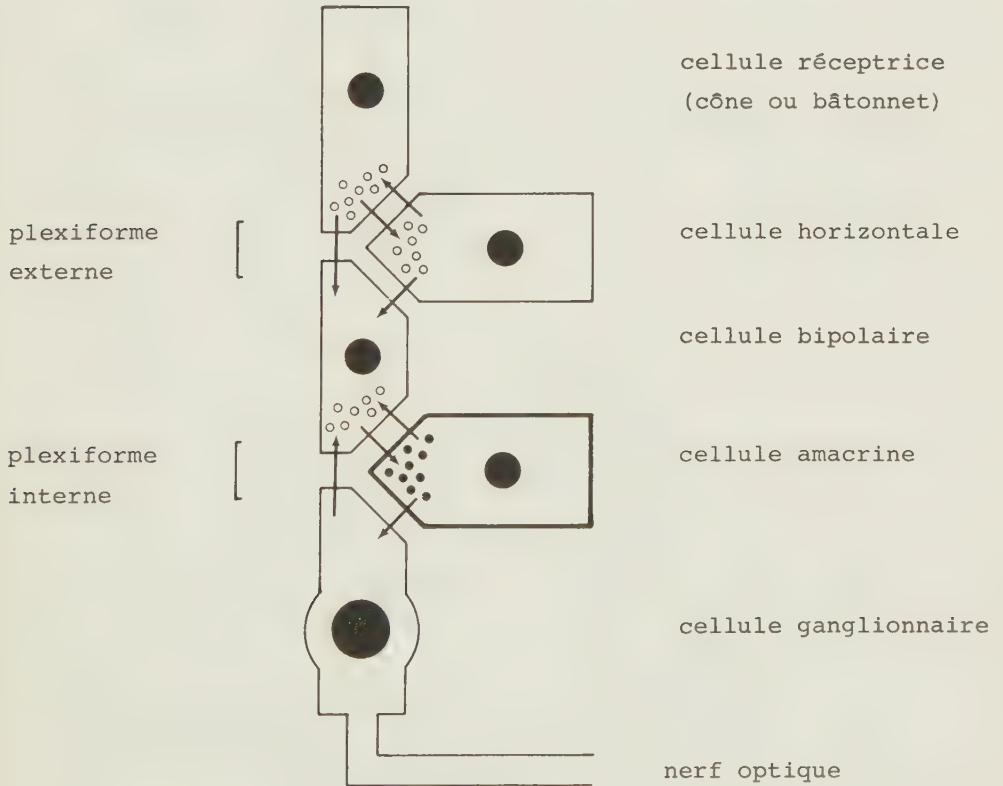


Figure 3

Schéma de la transmission nerveuse de la rétine.

La dopamine est stockée dans les vésicules des cellules amacrines. Lors de sa libération, elle active soit les cellules bipolaires soit les cellules ganglionnaires.

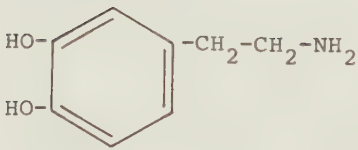


Modification d'une figure de Werblin ³².

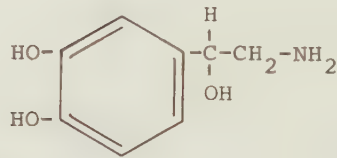
Figure 4

Structure chimique (catécholamines) des neurotransmetteurs des systèmes adrénérgiques et dopaminergiques.

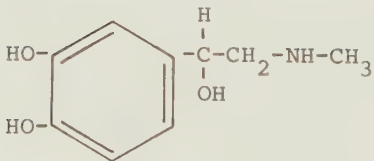
Dopamine



Noradrénaline



Adrénaline



Isoprotérénol

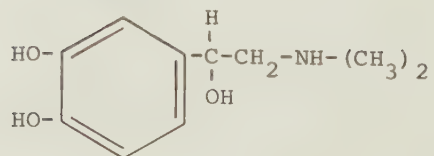
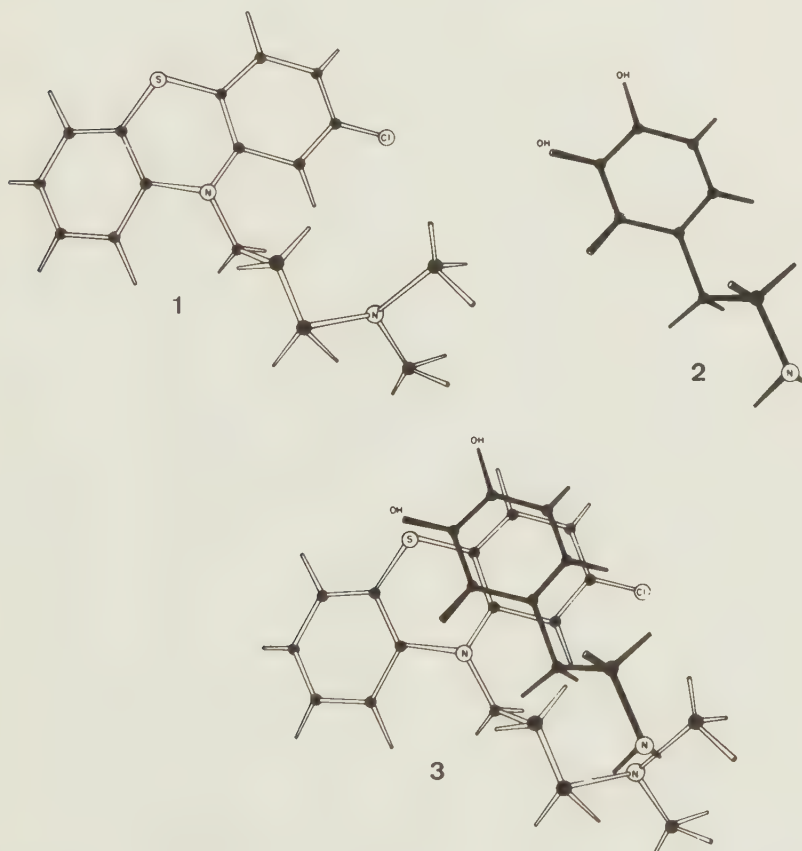


Figure 5

Modèle de Dreiding sur la structure moléculaire de la chlorpromazine (1) et de la dopamine (2). 3: superposition de la molécule de dopamine à une partie de la molécule de chlorpromazine *

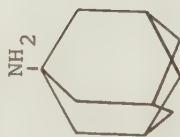


Selon Horn et Snyder ³⁶ (modifié).

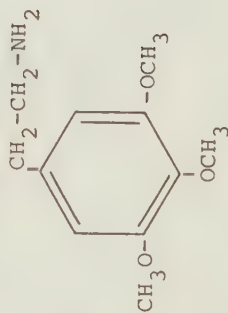
Figure 6

Comparaison des structures chimiques de la dopamine, amantadine et mescaline.

Amantadine



Mescaline



Dopamine

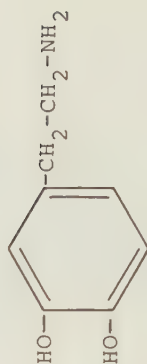


Tableau 1

Effets de l'halopéridol, de la chlorpromazine et de la phentolamine sur la production d'AMPC* induite par la dopamine dans des homogénats de rétines de lapin.

Hormone	μM	Δ	halopéridol (50 μM)	chlorpromazine (50 μM)	phentolamine (50 μM)
Dopamine	10	112,3		- 4,8	+ 12,8
Dopamine	100	121,6	- 1,5		

* pmoles AMPC.mg protéine⁻¹.2,5 min⁻¹.

Tableau 2

Effets de l'halopéridol sur la formation d'AMPc induite par la dopamine, l'apomorphine, l'adrénaline et la noradrénaline dans la rétine isolée de lapin.

	Δ pmoles AMPc.mg protéine ⁻¹ * ($\pm$ S.E.M.)	
100 μ M	-Halopéridol	+500 μ M Halopéridol
dopamine	26.3 $\pm$ 4.6	10.0 $\pm$ 6.7
apomorphine	43.1 $\pm$ 10.2	2.0 $\pm$ 3.4
adrénaline	22.4 $\pm$ 3.0	8.7 $\pm$ 2.3
noradrénaline	21.5 $\pm$ 3.1	11.2 $\pm$ 4.7

* résultats exprimés en Δ par rapport aux valeurs de contrôle.

Tableau 3

Concentration d'AMPC dans les rétines intactes de lapins en réponse à la dopamine, la mescaline et l'amantadine.

AMPC pmoles.mg protéine ⁻¹ (+ S.E.M.)			
Contrôle	dopamine (100 µM)	amantadine (100 µM)	mescaline (10 µM)
15.1 ± 1.5	41.5 ± 4.2		
16.6 ± 1.5		13.5 ± 1.1	
14.9 ± 1.4			15.6 ± 0.6

Tableau 4

Schéma de classification des récepteurs adrénergiques*

	Types de récepteurs		
	Alpha	Beta	Dopamine
Puissance des agonistes :	NA>E>D>I	I>E>NE>>D	D>>>E, NE, I
Blocage sélectif par :	phenoxybenzamine	dichloroisoprotérénol	halopéridol
	phentolamine	propranolol	chlorpromazine
	ergotamine		

NE : noradrénaline E : adrénaline D : dopamine I : isoprotérénol

* selon Moran³⁵ (modifié).

REFERENCES

- 1) Blaschko H. (1957)
Metabolism and storage of biogenic amines.
Experientia 13, 9.
- 2) Hornykiewicz O. (1971)
Pharmacology and pathophysiology of dopaminergic neurons.
Advances in Cytopharmacology, vol. I : First International Symposium on Cell Biology and Cytopharmacology, Raven Press, New York, 369.
- 3) Hornykiewicz O. (1966)
Dopamine (3-hydroxytyramine) and brain function.
Pharmacol. Rev. 18, 925.
- 4) Häggendal J. and Malmfors T. (1963)
Evidence of dopamine-containing neurons in the retina of rabbits.
Acta physiol. scand. 59, 295.
- 5) Andén N.-E., Carlsson A., Dahlström A., Fuxe K., Hillarp N.A. and Larsson K. (1964)
Demonstration and mapping out of nigro-neostriatal dopamine neurons.
Life Sciences 3, 523.
- 6) Fuxe K. (1965)
Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. IV : Distribution of monoamine nerve terminals in the central nervous system.
Acta physiol. scand. 64, suppl. 247, 37.
- 7) Andén N.-E., Dahlström A., Fuxe K., Larsson K., Olson L. and Ungerstedt U. (1966)
Ascending monoamine neurons to the telencephalon and diencephalon.
Acta physiol. scand. 67, 313.

- 8) Häggendal J. and Malmfors T. (1965)
Identification and cellular localization of the catecholamines in the retina and the choroid of the rabbit.
Acta physiol. scand. 64, 58.
- 9) Mc Lennan H. (1963)
Synaptic transmission : The concept of chemical transmission.
Philadelphia, W.B. Saunders Company, p. 23.
- 10) Kramer S.G. (1971)
Dopamine : a retinal neurotransmitter.
Investigative ophthalmology 10, 438.
- 11) Brown J.H. and Makman M.H. (1972)
Stimulation by dopamine of adenylate cyclase in retinal homogenates and of adenosine-3':5'-cyclic monophosphate formation in intact retina.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 69, 539.
- 12) Kebabian J.W. and Greengard P. (1971)
Dopamine-sensitive adenylyl cyclase : Possible role in synaptic transmission.
Science New York, 174, 1346.
- 13) Greengard P., McAfee D.A. and Kebabian J.W. (1972)
Advances in cyclic nucleotide research, vol. I.
Raven Press, New York, p. 337.
- 14) Kebabian J.W., Petzold G.L. and Greengard P. (1972)
Dopamine-sensitive adenylate cyclase in caudate nucleus of rat brain, and its similarity to the "dopamine receptor".
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 69, 2145.
- 15) Horn A.S., Cuello A.C. and Miller R.J. (1974)
Dopamine in the mesolimbic system of the rat brain : endogenous levels and the effects of drugs on the uptake mechanism and stimulation of adenylate cyclase activity.
J. Neurochem. 22, 265.

- 16) Clément-Cormier Y.C., Kebabian J.W., Petzold G.L. and Greengard P. (1974)
Dopamine-sensitive adenylate cyclase in mammalian brain : a possible site of action of antipsychotic drugs.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 71, 1113.
- 17) Brown J.H. and Makman M.H. (1973)
Influence of neuroleptic drugs and apomorphine on dopamine-sensitive adenylate cyclase of retina.
J. Neurochem. 21, 477.
- 18) Pinder R.M. (1973)
Design of dopamine-like drugs.
Advances in neurology 3, Raven Press New York, p. 295.
- 19) Corrodi H., Fuxe K., Ungerstedt U. (1971)
Evidence for a new type of dopamine receptor stimulating agent.
J. Pharm. Pharmac. 23, 989.
- 20) Miller R.J. and Iversen L.L. (1974)
Effect of chlorpromazine and some of its metabolites on the dopamine-sensitive adenylate cyclase of rat brain striatum.
J. Pharm. Pharmac. 26, 142.
- 21) Miller R.J. and Iversen L.L. (1974)
Effect of psychoactive drugs on dopamine (3,4-dihydroxy-phenethylamine)-sensitive adenylate cyclase activity in corpus striatum of rat brain.
Biochem. Soc. Transactions 2, 256.
- 22) Papeschi R. (1974)
Amantadine may stimulate dopamine and noradrenaline receptors.
Neuropharm. 13, 77.
- 23) Clemente E. and Lynch V. de Paul (1968)
In vitro action of mescaline. Possible mode of action.
J. Pharmac. Sci. 57, 72.

- 24) Albano J.D.M., Maudsley D.V., Brown B.L. and Barnes G.D. (1973)
A simplified procedure for the determination of adenylate cyclase activity.
Biochem. Soc. Transactions 1, 477.
- 25) Brown B.L., Albano J.D.M., Ekins R.P. and Sgherzi A.M. (1971)
A simple and sensitive saturation assay method for the measurement of adenosine 3'5' cyclic monophosphate.
Biochem. J. 121, 561.
- 26) Lees M.B. and Paxman S. (1972)
Modification of the Lowry procedure for the analysis of proteolipid protein.
Analyt. Biochem. 47, 184.
- 27) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. and Randall R.J. (1951)
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. biol. Chem. 193, 265.
- 28) Bucher M.B. and Schorderet M. (1974)
Selective stimulation by dopamine of adenylate cyclase in homogenates of rabbit retina.
Experientia 30, 694.
- 29) Schorderet M. and Bucher M.B. (1974)
Cyclic AMP formation in intact cells or in homogenates of rabbit retinas in response to dopamine receptor activating drugs.
Second International Conference on cyclic AMP, Vancouver.
Book of Abstracts Tu A-26, p. 42.
- 30) Bucher M.B. and Schorderet M. (1974)
Apomorphine-induced accumulation of cyclic AMP in isolated retinas of the rabbit.
Biochem. Pharmac. 23, 3079.
- 31) Werblin F.S. (1973)
The control of sensitivity in the retina.
Scientific American 228, 71.

- 32) Michael C.R. (1969)
Retinal processing of visual images.
Scientific American 220, 105.
- 33) Greengard P. and Kuo J.F. (1970)
On the mechanism of action of cyclic AMP.
Adv. Biochem. Psychopharmac. 3, 287.
- 34) Moran N.C. (1973)
The classification of adrenergic receptors, p. 291.
Frontiers in catecholamine research.
Edited by E. Usdin and S.H. Snyder. Pergamon Press.
- 35) Horn A.S. and Snyder S.H. (1971)
Chlorpromazine and dopamine : conformational similarities
that correlate with the antischizophrenic activity of
phenothiazine drugs.
Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A. 68, 2325.
- 36) Ehringer H. und Hornykiewicz O. (1960)
Verteilung von Noradrenalin und Dopamin (3-Hydroxytyramin)
im Gehirn des Menschen und ihr Verhalten bei Erkrankungen
des extrapyramidalen Systems.
Klin. Wschr. 38, 1236.
- 37) Goldstein M., Freedman L.S. and Backstrom T. (1970)
The inhibition of catecholamine biosynthesis by apomorphine.
J. Pharm. Pharmac. 22, 715.
- 38) Pinder R.M., Buxton D.A. and Green D.M. (1971)
On the dopamine-like action of apomorphine.
J. Pharm. Pharmac. 23, 995.
- 39) Fekete M. and Kurti A.M. (1970)
On the dopaminergic nature of the gnawing compulsion
induced by apomorphine in mice.
J. Pharm. Pharmac. 22, 377.
- 40) Cheng H.C. and Long J.P. (1974)
Dopaminergic nature of apomorphine-induced pecking in
pigeons.
Eur. J. Pharm. 26, 313.

34.

- 41) Vaatstra W.J. and Eigeman L. (1974)
Dopamine turnover in the rat corpus striatum : in vivo
and in vitro studies on the action of amantadine.
Eur. J. Pharm. 25, 185.
- 42) Robison G.A., Butcher R.W. and Sutherland E.W. (1971)
Cyclic AMP.
Academic Press New York, p. 36.

